

# 马尾松离体培养条件下的微繁殖 和菌根的形成\*

成小飞 花晓梅 李文钊

**摘要** 以马尾松种胚作外植体进行不定芽诱导。基本培养基的种类对外植体不定芽的诱导起着决定性的作用,在GD附加2.0 mg/L BA 的培养基上,外植体不定芽诱导率达70%以上。IAA 或 NAA 的加入不利于外植体不定芽的诱导。在不定芽生长培养基中,加入适量的 IBA 能促进不定芽的伸长生长。伸长至0.5 cm 以上的嫩枝在1/2 GD附加4.0 mg/L IBA 的培养基上,生根状况良好。生根后的小植株,在1/2 GD 培养基上接种 Rt49 菌根真菌,菌丝侵入进入根部,形成组培菌根植株。

**关键词** 马尾松、离体培养、菌根

马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)是我国南方的主要造林树种。已有许多试验表明菌根真菌与松根共生是松属树种正常生长和发育的必要条件<sup>[1]</sup>。本试验试图在离体条件下首先通过组织培养技术产生大量马尾松再生小植株,然后在培养基上接种菌根真菌使其形成菌根,为提高松苗的产量和质量提供一套有效的生物技术。

早在60年代,国外就开始了重要松树组织培养的探索<sup>[2]</sup>。30多年来虽曾以胚、子叶、腋芽和短枝等为外植体对10余种松进行了再生植株的研究,但大多数只得到了不定芽丛或伸长的不定枝,只有少数几种能够获得生根的小植株<sup>[3~6]</sup>,至今生根仍然是一个难题。吴若青<sup>[7]</sup>曾报道获得了马尾松丛生芽,但至今未见有成功地获得再生植株的报道。

至于菌根接种,大多以实生苗为材料,以土壤和泥炭藓等为基质。1974年,Pachlewski等<sup>[9]</sup>曾在大试管固体琼脂基质中对欧洲赤松(*Pinus sylvestris* L.)进行菌根合成,其效果优于泥炭藓等其它基质。迄今为止,在试管中,用马尾松组培苗进行菌根接种,尚未见报道。

## 1 材料与方 法

马尾松种子除去外种皮,用70%乙醇消毒1 min,然后用0.1%HgCl<sub>2</sub>消毒10 min,无菌水洗4~5次,剥取种胚接入不定芽诱导培养基中。置于光照培养箱内,温度为25±1℃,光照强度约为1500 lx,光照周期为15 h光照,9 h黑暗。

### 1.1 不定芽诱导培养基

分别选用MS、GD、SH及MCM培养基,加入2%蔗糖,0.4%琼脂粉,将pH值调至5.8左右,附加不同浓度的BA(6-苄基嘌呤)和IAA(吲哚乙酸),按L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交试验设计<sup>[9]</sup>。

在上述试验的基础上,进一步对培养基和激素配比进行试验。在GD和SH两种培养基上,分别加入1.0~5.0 mg/L BA和0~0.1 mg/L IAA,按正交表L<sub>8</sub>(4<sup>1</sup>×2<sup>4</sup>)设计。

1994—11—03 收稿。

成小飞助理研究员、李文钊(中国林业科学研究院森林生态环境研究所 北京 100091);花晓梅(中国林业科学研究院林业研究所)。

\* 本文为“八五”攻关课题“湿地松、马尾松、火炬松、落叶松、桉树菌根应用技术研究”部分内容。

## 1.2 不定芽生长培养基

外植体在不定芽诱导培养基上生长 30 d 左右(或稍长)转入 1/2GD(大量元素)、1/2GD(大量元素)附加 IBA 0.1 mg/L 或 GA 0.5 mg/L 的培养基上,促进不定芽伸长,每隔 30 d 转换一次新鲜培养基。

## 1.3 不定根的形成和菌根接种

切取长至 0.5 cm 以上的不定枝,接入 1/2 GD(大),加 IBA(吲哚丁酸)2.0 或 4.0 mg/L 的生根培养基上,在不定枝生根的同时或不定根形成后接种 Rt49 菌根真菌。将切取嫩枝后的剩余部分,转入 1/2 GD(大)或 1/2 GD(大)加 BA 0.5 mg/L 的培养基上,使不定芽继续生长。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基种类和激素浓度对外植体诱导的影响

从消毒后的种子中剥出种胚,接入按  $L_{16}(4^5)$  正交设计的不定芽诱导培养基中,30 d 后观察外植体生长状况,结果见表 1。

表 1 不同培养基和激素浓度上外植体存活率

培养基号	培养基种类	BA(mg/L)	IAA(mg/L)	接种外植体数(个)	外植体存活数(个)	存活率(%)
1	GD	0.5	0	28	26	93
2	GD	1.0	0.1	32	30	94
3	GD	2.0	0.5	28	18	64
4	GD	4.0	1.0	22	12	55
5	SH	0.5	0.1	25	18	72
6	SH	1.0	0	20	14	70
7	SH	2.0	1.0	31	24	77
8	SH	4.0	0.5	29	15	52
9	MS	0.5	0.5	30	9	30
10	MS	1.0	1.0	30	6	20
11	MS	2.0	0	30	6	20
12	MS	4.0	0.1	30	0	0
13	MCM	0.5	1.0	30	8	27
14	MCM	1.0	0.5	27	11	41
15	MCM	2.0	0.1	28	11	39
16	MCM	4.0	0	30	4	13

在 GD 和 SH 培养基上,大部分外植体生长,保持绿色,当 BA 浓度为 0.5~2.0 mg/L 时,外植体存活率在 60% 以上。在 MS 和 MCM 两种培养基上,无论 BA 和 IAA 浓度高低,大多数种胚外植体黄化,死亡,只有少量的外植体保持绿色,但胚芽端不膨大,转入 GD 或 1/2 GD 培养基上,外植体仍不能正常生长,最后死亡。因此,表 1 表明,决定马尾松种胚外植体存活率的首要因素是基本培养基的种类,GD 培养基最好,SH 其次,MS 和 MCM 培养基则不适用。由于 MS 和 MCM 培养基上的外植体大部分死亡,影响了对 BA 和 IAA 浓度的筛选,因此,进一步试验了 GD 和 SH 培养基及 BA 和 IAA 浓度对外植体不定芽诱导的影响,表 2 结果表明,首先对外植体不定芽诱导影响最大的仍然是培养基种类,GD 和 SH 两种培养基上不定芽诱导率的极差  $R$  最大,为 57。GD 培养基较 SH 更适用于马尾松不定芽的诱导。其次是培养基中加入或

**表 2 培养基和激素浓度对外植体不定芽诱导的影响**

培养 基号	BA (mg/L)	培养基 种 类	IAA (mg/L)	接种数 (个)	被诱导 的外植 体 数 (个)	诱导率 (%)
1	1.0(1)	SH(1)	0 (1)	40	18	45
2	1.0(1)	GD(2)	0.1(2)	29	16	55
3	2.0(2)	SH(1)	0.1(2)	33	16	48
4	2.0(2)	GD(2)	0 (1)	35	27	77
5	4.0(3)	SH(1)	0 (1)	25	15	60
6	4.0(3)	GD(2)	0.1(2)	38	22	58
7	5.0(4)	SH(1)	0.1(2)	52	17	33
8	5.0(4)	GD(2)	0 (1)	49	26	53
L1	100	186	235			
L2	125	243	194			
L3	118					
L4	86					
R	39	57	41			

注:L代表各处理水平上诱导率之和;R代表各处理中最大诱导率与最小诱导率之差。

培养基中加入 NAA 后,不定芽诱导率均低于 40%,并且在下胚轴上诱导产生愈伤组织。因此与 IAA 一样,NAA 也不利于种胚外植体上不定芽的诱导。

对于大多数树种,细胞分裂素是离体器官发生必需的外源激素,细胞分裂素与生长素适当配比通常决定器官发生的类型,但在许多针叶树培养中,仅附加细胞分裂素就可以诱导不定芽发生,例如,辐射松(*Pinus radiata* D. Don)子叶在 BA 的诱导下,可以形成不定芽<sup>[10]</sup>。

外植体接入不定芽诱导培养基后,胚体逐渐变为绿色,胚芽端膨大,子叶先端形成小突起。但在接种时,如果将子叶置于培养基上,则绝大部分死亡,胚芽端不定芽诱导率也降低。

## 2.2 不定芽的伸长

外植体接入不定芽诱导培养基 30 d 后或稍长,转入不定芽生长培养基,每隔 30 d 左右转换一次新鲜培养基。转入生长培养基后,在胚芽端逐渐生长出 3~7 个或更多的不定芽(图版 I-1,2),适当延长外植体诱导时间,有利于不定芽数量的增加。同时,在多个子叶的先端也形成 1~2 个不定芽。

在 1/2 GD(大)培养基上,外植体上不定芽生长正常但较缓慢,通常需转换 1~2 次生长培养基后,不定芽才能伸长用于切割生根。在 1/2 GD 中,加入适量的 IBA 后,IBA 诱导胚根端萎缩的胚根继续生长。胚根的生长,有利于营养的吸收和利用,不定芽伸长较在 1/2 GD 培养基中快。一般转换一次新鲜培养基(60 d 左右),即可进行切割生根。在 1/2 GD 培养基中加入 GA 后,外植体逐渐变黄,50%以上的外植体在培养一段时间后,即黄化死亡,存活的外植体转入 1/2 GD 或 1/2 GD+IBA 0.1 mg/L 的培养基上,仍然不能恢复正常生长,最终死亡。在附加 GA 的同时,加入少量 IBA,外植体存活率提高,但不能改变其生长状况。

在针叶树组织培养中,经常遇到外植体生长缓慢的问题,一方面可能是因为树种本身细胞

不加入 IAA。培养基中不加入 IAA 更有利于外植体上不定芽的诱导。第三为细胞分裂素 BA 浓度。IAA 加入与否和 BA 浓度对外植体不定芽诱导率影响差异不明显,极差 R 分别为 41 和 39。不定芽诱导培养基的最佳组合为 GD+2.0 mg/L BA,不加 IAA,不定芽诱导率为 77%。

激素对外植体不定芽诱导的影响,一方面与激素浓度有关,另一方面与激素种类有关。为了更进一步研究生长素类对马尾松不定芽诱导的影响,在培养基中加入一定浓度的 NAA,观察其对不定芽诱导的影响,结果见表 3。

**表 3 NAA 对外植体不定芽诱导的影响**

培养 基号	培养基 种 类	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	外植体 数(个)	诱导数 (个)	诱导率 (%)
1	SH	2.0	0.01	54	19	35
2	SH	4.0	0.20	38	13	34
3	GD	2.0	0.05	62	22	35
4	GD	4.0	0.10	55	13	24

分裂频率低,生长缓慢;另一方面可能因为外植体营养需求和吸收不平衡,导致营养供给不足。在马尾松不定芽生长培养基中加入适量的 IBA,诱导外植体基部维管组织或根的分化,有利于营养的吸收,从而加速不定芽的伸长生长。GA 对细胞伸长有着较强的控制作用<sup>[11]</sup>。在一些植物离体培养诱导腋芽伸长时,在培养基中加入适量的 GA,能促进腋芽的生长<sup>[12]</sup>。本文试验结果表明,GA 不能促进马尾松不定芽的生长。前人也有类似的报道<sup>[13]</sup>。

### 2.3 不定根和菌根的形成

当不定芽伸长至 0.5 cm 以上,即可割取嫩枝接入 1/2 GD+IBA 2.0 或 4.0 mg/L 的生根培养基中。在 1/2 GD+IBA 4.0 mg/L 的培养基上培养约 20 d 后,嫩枝基部形成 1~4 条,长约 0.2~0.3 cm 的白色根(图版 I-3,4)。在嫩枝基部与不定根之间无愈伤组织形成。在 1/2 GD+IBA 2.0 mg/L 的培养基上,嫩枝基部既无愈伤组织形成也不产生不定根。在嫩枝接入生根培养基时,同时接入 Rt49 菌根,菌根真菌迅速生长,覆盖培养基表面,嫩枝基部不形成不定根。这个结果表明菌根真菌 Rt49 的接入,不能促进嫩枝上不定根的形成。但当嫩枝生根后,将生根小植株和菌根真菌同时接入 1/2 GD 培养基上,则可见菌丝包裹根尖(图 I-5,6)。关于马尾松根与 Rt49 真菌共生的解剖学观察将另文报道。

综上所述,本试验首次在离体培养条件下,以马尾松种胚为外植体获得了再生小植株,然后在无菌条件下接种菌根真菌 Rt49,合成组培菌根苗。

### 参 考 文 献

- 1 Robert K D, Donald H M. Mycorrhizae. In: Bonga J M, Durzan D J(ed). Cell and tissue culture in forestry(2). Dordrecht; Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 336~350.
- 2 桂耀林, 顾淑荣, 徐廷玉. 松树的组织培养. 见: 崔薇, 桂耀林主编. 经济植物的组织培养与快速繁殖. 北京: 农业出版社, 1985. 231~238.
- 3 David A. *In vitro* propagation of gymnosperms. In: Bonga J M and Durzan D J(ed). Tissue culture in forestry. The Hague; Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers, 1982. 72~108.
- 4 Bonga J M, Durzan D J(ed). Cell and tissue culture in forestry(3). Dordrecht; Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 42~166.
- 5 Sommer H E, Brown H E. Plantlet formation in pine tissue cultures. *Am. J. Bot.*, 1974, 11(suppl. 5)11.
- 6 Reilly K, Washer J. Vegetative Propagation of radiata pine by tissue culture; Plantlet formation from embryo tissue. *NZ, For. Sci.*, 1977, 7: 199.
- 7 吴若青. 马尾松离体组织培养初报. *福建林学院报*, 1993, 13(2): 98~100.
- 8 Pachlewski R. Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of *Pinus silvestris* L. with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar. In: Schenck N C(ed). Methods and principles of mycorrhizal research. U. S. A., 1974. 124.
- 9 杨纪珂, 孙长鸣, 汤旦林. 应用生物统计. 北京: 科学出版社, 1983. 249~258.
- 10 Aiteken J, Horgan K J, Thorpe T A. Influence of explant selection on the shoot forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. *Can. J. For. Res.*, 1981, 11(1): 112~117.
- 11 Zaerr J B, Mapes M O. Action of growth regulators. In: Bonga J M, Durzan D J(ed). Tissue culture in forestry. The Hague; Martinus Nijhoff/Dr. Junk, 1982. 231~255.
- 12 李玉龙, 吴德玉, 潘淑珑, 等. 牡丹的快速无性繁殖. 见: 罗士韦, 智宏主编, 经济植物组织培养. 北京: 科学出版社, 1988. 170~175.
- 13 von Arnold S, Eriksson T. Induction of adventitious buds on embryos of Norway spruce grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 1978, 44(2): 283~287.

## Micropropagation and Mycorrhizae Formation

### of *Pinus massoniana* Lamb. *in vitro*

Cheng Xiaofei Hua Xiaomei Li Wendian

**Abstract** The mature embryos of *Pinus massoniana* were used as explants to induce adventitious buds on GD, SH, MS or MCM medium supplemented with 0.5~4.0 mg/L BA and 0.0~1.0 mg/L IAA. It has been showed that the basic medium played a determinative role in initiating the adventitious buds. The optimal combination of the medium was GD+2.0 mg/L BA without IAA, on which over seventy percent of explants was induced. The addition of IAA or NAA was disadvantageous to the formation of adventitious buds. By adding optimal concentration of IBA in the growth medium, the elongation of the adventitious buds was improved. The elongated shoots were induced to produce adventitious roots on 1/2 GD medium supplemented with 4.0 mg/L IBA. Both the plantlets and mycorrhizal fungi Rt49 were inoculated on 1/2 GD medium simultaneously. The mycorrhizal fungi infected the root tips and then mycorrhizae formed.

**Key words** *Pinus massoniana*, *in vitro*, mycorrhizae

---

Cheng Xiaofei, Assistant Professor, Li Wendian (The Research Institute of Ecology and Environment, CAF Beijing 100091); Hua Xiaomei (The Research Institute of Forestry, CAF).

